

## Penentuan tetrasiklin dan derivatnya dalam udang dan ikan secara kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)





## Daftar isi

Daftar isi.....	i
1 Ruang lingkup.....	1
2 Bahan kimia .....	1
3 Peralatan .....	2
4 Prosedur .....	3
5 Diagram .....	5
Bibliografi .....	6





## Penentuan tetrasiklin dan derivatnya dalam udang dan ikan secara kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)

### 1 Ruang lingkup

Metoda ini dapat diterapkan untuk analisa antibiotik jenis tetrasiklin beserta turunannya yang terdapat pada hasil budidaya perikanan, baik untuk jaringan daging, serum maupun hati. Contoh diextrak dengan larutan Buffer Phosphat pH=4, kemudian dimurnikan dengan disaring pada C-18 Cartridge. Hasil pemurnian dipekatkan dicentrifuge dan disaring dengan mikrofilter 0,2  $\mu$ m.

Penetapan jenis (kuali) dan jumlah (kuanti) tetrasiklin dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Batas deteksi dari metoda ini mencapai 0,013 ppm (13 ppb).

### 2 Bahan kimia

#### 2.1 Asam citrat ( $C_6H_8O_7H_2O$ ) 0,1 M

Timbang 21,014 g  $C_6H_8O_7H_2O$ , larutkan dan tepatkan volume hingga 1 liter dalam labu volumetrik.

#### 2.2 Disodium hidrogen phosphate ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) 0,2 M

Timbang 35,598 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , larutkan dan tepatkan volumenya hingga 1 liter dalam labu volumetrik.

#### 2.3 Buffer pengekstrak

Campur 62 bagian larutan asam sitrat 0,1 M (No. 1) dengan 38 bagian larutan disodium hidrogen phosphate 0,2 M (No. 2) dan atur pH buffer ini hingga tepat pH 4. Larutan ini harus disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam sebelum digunakan.

#### 2.4 Kolom pemurnian: C-18 solid phase extraction coulom

#### 2.5 Disodium ethylen diamintetraasetat ( $Na_2EDTA$ ) 5%

Timbang 50 g  $Na_2EDTA$  larutkan dengan aquades dan tepatkan volumenya menjadi 1 liter dalam labu volumetrik.

#### 2.6 Asam oksalat ( $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ ) metanolik 0,01 M

Timbang 1,2607 g  $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ , larutkan dengan methanol proanalisis (P,A) dan tepatkan volumenya menjadi 1 liter dalam labu volumetrik.

#### 2.7 Metanol ( $CH_3OH$ ) HPLC grade

#### 2.8 Acetonitril ( $CH_3CN$ ) HPLC grade



**2.9 N-N dimethylformamida ( $C_3H_7NO$ )****2.10 Asam oksalat ( $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ ) 0,01 M**

Timbang 1,2607 g  $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ , larutkan dengan aquabides dan tetapkan volumenya menjadi 1 l dalam labu volumetrik. Larutan ini harus disaring dengan membran filter 0,22  $\mu m$  sebelum digunakan.

**2.11 Larutan pengelusi contoh dalam sistem HPLC (mobilphase)**

Campur 27 bagian acetonitril HPLC grade (No. 8); 6 bagian N-N dimethylformamida (No. 9) dan 67 bagian asam oksalat 0,01 M (No. 10) atur pH larutan ini hingga tepat pH 2,1

**2.12 Disodium ethylene diaminetetraasetat ( $Na_2EDTA$ )**

0,05 M larutkan 18,612 g  $Na_2EDTA$  dengan aquabides dan tetapkan volumenya menjadi 1 liter dalam labu volumetrik. Atur pH larutan ini dengan NaOH 10 M ini hingga pH tepat 7.

**2.13 Campuran acetonitril HPLC grade aquabides (50:50) mengandung 0,1 mg klortetrasiklin/1ml****2.14 Campuran acetonitril HPLC grade dengan aquabides (50:50)**

larutan No. 12 s/d 14 hanya digunakan untuk mengaktifkan coulomb (konditioning coulomb) pada awal penggunaan coulomb baru

**2.15 Standar murni (pure)**

- a) oksitetrasikline hidroklorida;
- b) tetrasikline hidroklorida;
- c) klortetrasikline hidroklorida; dan
- d) doxycykline hidroklorida.

**3 Peralatan**

- a) peralatan glass : beaker glass; 100 ml, 250 ml; gelas ukur: 100 ml; tabung sentrifuge: 15 ml dan 50 ml; tabung sentrifuge berskala: 10 ml dan 50 ml, corong, botol sampel 100 ml, test tube 30 ml (170 x 15) , pipet volumetrik : 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml; vial botol : 2 ml dan 10 ml; pengaduk gelas;
- b) spuit, syringe plastik : 5 ml, 10 ml;
- c) homogenizer (tisu blender);
- d) ultrasonik bath (degassing);
- e) vacuum evaporator;
- f) unit vacuum filter untuk penyaring eluen (mobilphase); dan



- g) unit alat kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) terdiri dari: pompa, sistem pengaliran pelarut coloum: goard (30 x 4,6 nm) dan analitical coulom (100 x 4,6 nm), yang dipak dengan oktodecylcilicalgel-spheri 5 um. Injektorloop: kapasitas 20 ul; detektor UV – absorban dengan panjang gelombang yang dapat diatur, integrator Shimadzu CR 3 A.

## 4 Prosedur

### 4.1 Tahap ekstraksi

- Timbang 15 g contoh daging ikan / udang yang sudah dilumatkan,
- Tambahkan 60 ml buffer pengestrak (pertahankan agar suhu buffer stabil pada suhu 4 °C selama melakukan ekstraksi,
- Blender sampai homogen,
- Sentrifuge pada 2500 rpm selama 15 menit, dan
- Saring menggunakan kertas whotman no.2 supernatan (I) ditampung. Endapan diekstrak kembali dengan mengulang dari tahap 4.1.2 s/d 4.1.5 dan supernatan (II) digabung dengan supernatan (I).

### 4.2 Tahap pemurnian (*clean-up*)

- Siapkan kolom pemurnian (C-18 *solidphase extraction coloum*),
- Pasang coulom pemurnian di atas test tube dengan posisi ujung kolom yang panjang di bagian bawah dan yang pendek di bagian atas. Semua eluen yang akan dielusikan, (dialirkan) diatur sedemikian rupa sehingga kecepatan alir 20 tetes/menit.
- Elusikan 15 ml etanol, hasil elusi dibuang,
- Elusikan 30 ml larutan Na<sub>2</sub>EDTA 5%, hasil elusi dibuang,
- Elusikan supernatan hasil ekstraksi, hasil elusi dibuang,
- Elusikan 90 ml aquabiden, hasil elusi dibuang,
- Pindahkan dan pasangkan kolom pemurnian yang telah dilewati eluen sampai tahap 4.2.6 pada tabung centrifuge berskala 50 ml, dan
- Tampung hasil pemurnian pada tabung centrifuge berskala 50 ml dengan mengelusikan 30 ml larutan asam oksalat metanolik 0,01 M melewati kolom pemurnian.

### 4.3 Tahap pemekatan

- Uapkan hasil pemurnian (4.2.8) menggunakan vakum evaporator sampai volume 1 ml,
- Centrifuge hasil pemekatan (4.3.1) pada 7500 rpm selama 15 menit,
- Siapkan vial botol dan pipet volumetrik 1 ml yang sudah dibilas dengan metanol, dan
- Pipet supernatan secara hati-hati (endapan tidak boleh terbawa), masukkan supernatan dalam vial 2 ml dan simpan pada suhu –20 °C sampai akan dianalisa dengan HPLC.



#### 4.4 Tahapan penetapan

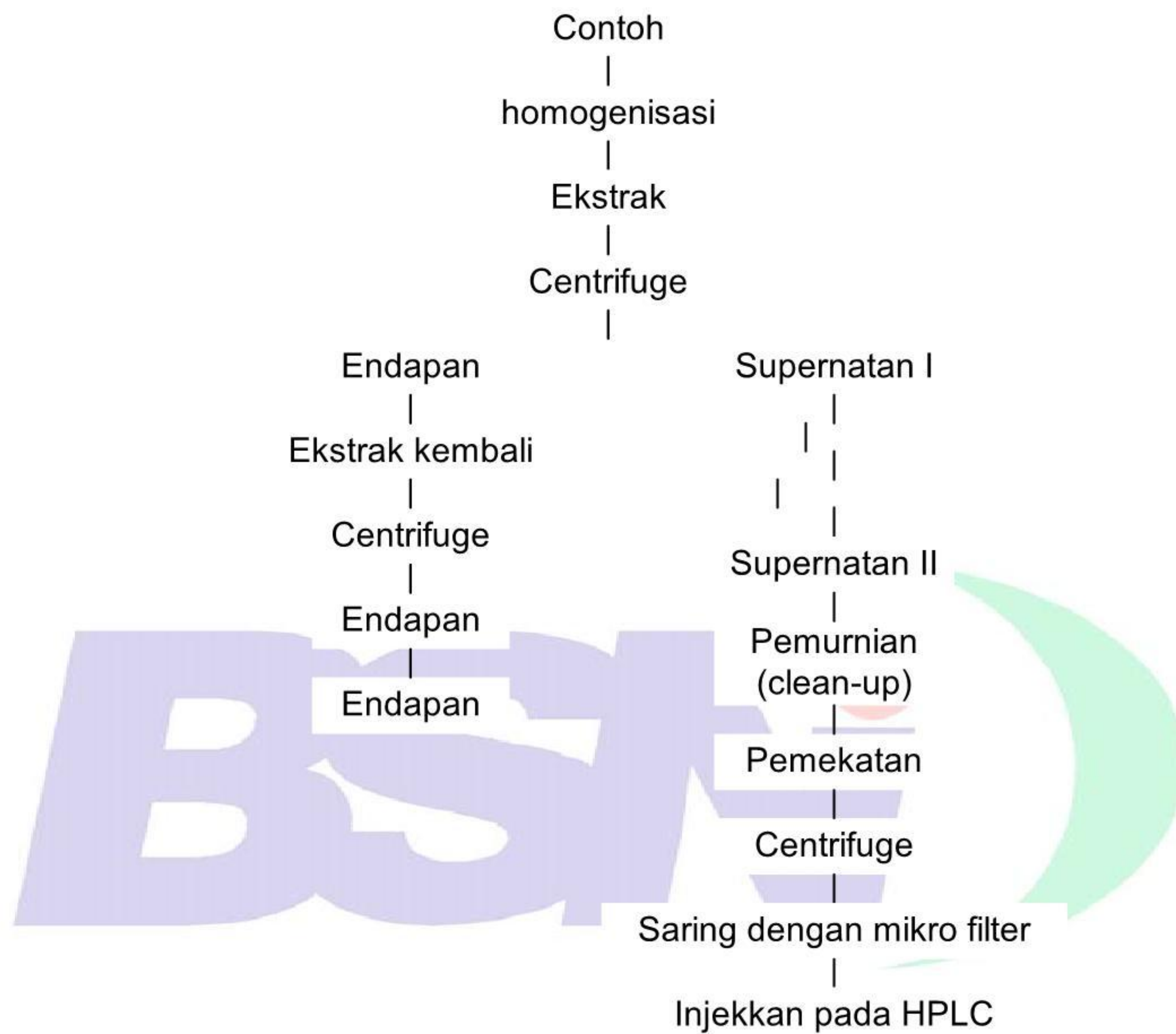
1. Hidupkan unit peralatan kromatografi dengan kondisi operasi sbb:
  - Kecepatan alir larutan pengelusi contoh (mobilphase) 1 ml/menit;
  - Panjang gelombang 355 nm;
  - Sensitivitas detektor 0,02 AUFS.
2. Alirkan metanol selama  $\pm 15$  menit.
  - Siapkan larutan-larutan standar dengan membuat larutan stok dalam metanol masing-masing 1000 ppm,
  - Siapkan juga larutan standar 100 ppm dan 10 ppm dengan mengencerkan larutan stok,
  - Siapkan campuran larutan-larutan standar 10 ppm dengan perbandingan sama,
  - Siapkan larutan standar kerja dengan mengencerkan larutan standar 10 ppm menjadi 2 deret larutan yang diencerkan berurutan sbb.:
    - \*) 1, 2, 4 dan 8 ppm
    - \*) 100, 200, 400 dan 800 ppb,
3. Gantikan metanol dengan mobilphase sampai pompa menunjukkan tekanan yang konstan.
4. Atur integrator dengan memprogram sehingga diperoleh garis dasar (baseline) yang normal.
5. Injeksikan larutan standar kerja masing-masing dan standar campuran dengan volume injek 20 ul.
6. Injeksikan larutan contoh secara berurutan dengan volume injek yang sama dengan standar.
7. Identifikasi puncak (peak) contoh terhadap standar dengan membandingkan waktu retensi yang sesuai.
8. Injeksikan larutan standar yang mempunyai waktu retensi sama dengan contoh untuk membuat kurve standar dan sesuaikan konsentrasinya dengan melihat luas puncak contoh (peak).
9. Bila rangkaian injeksi standar dan contoh selesai, bilaslah kolom dengan mengelusikan metanol sampai pH tetesan elusi netral (pH=7).
10. Matikan kembali seluruh unit kromatografi.

#### 4.5 Pengamatan data

- a) Buat analisa korelasi regresi standar lengkap dengan grafiknya,
- b) Hitung konsentrasi contoh dengan memasukkan luas puncak ke persamaan garis regresi standar, dan
- c) Nyatakan kandungan tetrasiklin contoh dalam mg/g (ppb).



## 5 Diagram



**Diagram 1 Penentuan tetrasiklin dan derivatnya dalam udang dan ikan secara kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)**



## Bibliografi

Bjorklund, Harry, 1988. Determination of Oxytetracycline in Fish by High Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography, 432. hal : 381 – 387.















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.or.id](mailto:bsn@bsn.or.id)